



Department of Pediatrics  
Charles University, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine

Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic  
Tel./ Fax: + 420 224 910 478

## Oponentský posudek

# METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS: MECHANISM OF ACTIVATION

Disertační práce  
Postgraduální doktorský studijní program „Neurovědy“

**Mgr. Veronika Hlaváčková**

*Oddělení molekulární farmakologie, Ústav experimentální medicíny, AV ČR,  
(Ředitelka prof. MUDr. Eva Syková, DrSc)  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4*

**Školitel: MUDr. Jaroslav Blahoš, PhD**

### **Téma disertační práce**

Problematika, řešená v předložené práci Mgr. Veroniky Hlaváčkové je svojí neprobádaností přitažlivá a nová. Metabotropní glutamátový (mGlu) receptor jako objekt studia je volen z několika důvodů. Glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem u obratlovců. Metabotropní receptory mají unikátní strukturální vlastnosti. Třetí rodina receptorů, spřažených s G-proteiny je nová, první její zástupce byl vyklonován teprve před 15 lety. V současnosti, kdy se jednotlivé obory prolínají, je prostor disertační práce Mgr. Hlaváčkové na pomezí molekulární biologie, biochemie, molekulární farmakologie, molekulární neurologie a strukturální biologie. Řešení takto pojaté problematiky vyžadovalo neobyčejnou píli, pracovní nasazení, solidní znalosti, vytrvalost a systematickosti doktorandky a v neposlední řadě velmi kvalitní zázemí mateřského pracoviště.

### **Zpracování disertační práce**

Po stránce formální i obsahové má předložená disertační práce Mgr. Veroniky Hlaváčkové vynikající úroveň. Práce má rozsah 149 stran a je logicky členěna do čtyř hlavních oddílů. Po stručném souhrnu autorka předkládá teoretickou úvodní část, ve které přehledným a velmi dobře strukturovaným způsobem na 35 stranách uvádí do problematiky, shrnuje současný stav znalostí, odhaluje fascinující svět buněčné komunikace a uvádí do velké rodiny buněčných receptorů. V následné části vytyčuje cíle studií. V části experimentální, která má 28 stran, uvádí nejprve velmi srozumitelnou formou přehled použitých metod. Výsledky předkládané disertace jsou uvedeny zhuštěným, ale srozumitelným způsobem a jsou následně diskutovány ve světle dalších perspektiv zasvěceným způsobem v části čtvrté na osmi stranách. Srozumitelnost této části je výrazně podtržena zařazením velmi přehledných schémat navrženého modelu i mechanismu aktivace mGlu receptoru. Literární přehled obsahuje úctyhodných 324 položek. Integrované součásti předložené disertace jsou suplementa (I, II, další), která prezentují publikované práce doktorandky.

### **Cíle práce a jejich splnění, metody zpracování, výsledky práce:**

Autorka disertace si položila otázku: „Jakým způsobem dochází k přenosu signálu přes homodimerní mGlu receptor?“ Prokázala zvládnutí nejmodernějších metodických přístupů a jejich vyhodnocování při hledání odpovědi. Ve studiu role individuální podjednotky homodimerního mGlu receptoru využívá znalostí a pochopení strukturálně-funkčních vztahů GABA<sub>B</sub> receptoru. Navrhuje a posléze exprimuje chimérní funkční heterodimerní mGlu1 receptor R1c1:R1c2. Je velmi obtížné vytvořit systém kontrolované dimerizace. Mgr. Hlaváčková zvládla skvěle navrzení i přípravu konstruktů dimerních mGlu receptorů, cílenou mutagenezu, metody sekvenační. Následně si osvojila transfekce lidských linií HEK 293 a COS-7. Správnou expresi proteinů kontroluje pomocí imunofluorescence a Western blottingu. Správné poskládání dimeru receptoru na buněčném povrchu určuje pomocí metody TR-FRET, dále používá fluorescence F1AsH-značených buněk. Mgr. Hlaváčková si osvojuje a používá dále baterii velmi specifických a náročných testů funkčních testů.

Získané výsledky vedou k vyslovení hypotézy o aktivaci jen jedné z heptahelikálních domén při přenosu signálu na trimérení G-protein. Toto je podpořeno jak efektem mutace bránící vazbě G-proteinu, tak analýzou efektů negativního a pozitivního alosterického modulátoru. Prezentované nálezy mají výraznou terapeutickou potenci.

### **Komentář:**

K předložené práci nemám žádné výtky. Je jednou z nejpečlivěji zpracovaných disertací, kterou měl oponent možnost hodnotit. Doporučuji doktorandce a školiteli zvážit publikování velmi přehledného úvodu dizertace v odpovídajících periodických typu *Annual Review*. Možnost samostatné výzkumné práce v „Institut de Génomique Fonctionnelle, Department de Pharmacologie Moléculaire (Dynamique moléculaire de RCPG de la famille 3) v Montpellier obzory aplikantky výrazně rozšířila.

**Chci vyzvednout první autorství disertantky (školitel je korespondujícím autorem) v práci „Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR“, publikované ve významném časopise oboru, EMBO Journal.** Oponent s potěšením konstatuje, že Mgr. Hlaváčková nezapomíná i na publikování v češtině, jak dokumentuje její práce v Chemických listech a přehledová práce v sekci Farmakoterapie v Časopise lékařů českých. Rovněž další práce, publikované v prestižních časopisech (**Journal of Biological Chemistry**, **Clinical and Experimental Immunology**) přispívají výrazně do odborného písemnictví a dokumentují zcela přesvědčivě schopnost dizertantky publikovat v odborném domácím i zahraničním tisku.

### **Závěr:**

**Disertační práce Mgr. Veroniky Hlaváčkové přináší originální a významné poznatky s jednoznačným terapeutickým potenciálem a výrazným přínosem pro studium receptorů na úrovni národní a mezinárodní. V předložené disertační práci Mgr. Veronika Hlaváčková zcela nepochybně prokázala předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci. Doporučuji práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.**

V Praze, dne 2. prosince 2006

Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc  
Klinika dětského a dorostového lékařství  
1. lékařská fakulta University Karlovy v Praze